

Rola czynników neurotroficznych w procesach regeneracji układu nerwowego

The role of neurotrophic factors in regeneration of the nervous system

Bogusław Machaliński¹, Piotr Łażewski-Banaszak¹, Elżbieta Dąbkowska², Edyta Paczkowska¹, Monika Gołqb-Janowska³, Przemysław Nowacki³

¹Zakład Patologii Ogólnej, Katedra Fizjopatologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

²Samodzielna Pracownia Terapii Komórkowej, Katedra Fizjopatologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

³Katedra i Klinika Neurologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Neurologia i Neurochirurgia Polska 2012; 46, 6: 579-590

DOI: 10.5114/ninp.2012.32354

Streszczenie

Czynniki neurotroficzne regulują przeżycie, rozwój i funkcję tkanki nerwowej. Działają poprzez dwie klasy receptorów i aktywację różnych szlaków sygnałowych w komórkach docelowych. Poznanie fizjologicznej roli neurotrofin w utrzymaniu homeostazy ośrodkowego układu nerwowego oraz regeneracji uszkodzonej tkanki rozbudziło nadzieję na wykorzystanie ich w leczeniu ciężkich schorzeń neurodegeneracyjnych, m.in. stwardnienia bocznego zanikowego oraz choroby Parkinsona. Postęp wiedzy w obszarze farmakoterapii, terapii genowej oraz biologii komórek macierzystych umożliwił rozwój nowoczesnych form leczenia z zastosowaniem transplantacji komórek regenerujących. Mogą one w niedalekiej przyszłości doprowadzić do opracowania bezpiecznych i skutecznych form leczenia tych ciężkich i nieuleczalnych dotychczas schorzeń.

Słowa kluczowe: choroby neurodegeneracyjne, czynniki neurotroficzne, receptory neurotrofinowe, terapia komórkowa.

Abstract

Neurotrophic factors regulate survival, development, and function of nervous tissue. They act via two different classes of receptors and activation of various signaling pathways in the target cells. Illumination of their physiological role in the maintenance of central nervous system homeostasis as well as regeneration of damaged tissue have ignited expectations to heal neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson disease. Advances in pharmacotherapy, gene therapy, and stem cell biology have enabled development of novel therapies with application of regenerating cell transplantation. In the foreseeable future, it may lead to the establishment of safe and effective ways of treatment of these severe and currently incurable diseases.

Key words: neurodegenerative diseases, neurotrophic factors, neurotrophic receptors, stem cell-based therapy.

Wstęp

Regeneracja tkanki nerwowej jest procesem ograniczonym, regulowanym przez właściwości środowiska tkankowego, które z kolei są zależne od zmian w fizjologii organizmu. Koncepcja ta po raz pierwszy została sformułowana na przełomie XIX i XX w. przez prekur-

sorów neurobiologii – Santiago Ramóna y Cajala i Francisco Tello [1]. W latach 50. ubiegłego stulecia Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger i Stanley Cohen [2] odkryli i zdefiniowali właściwości czynnika wzrostu nerwów (*nerve growth factor* – NGF). W kolejnych latach opisano inne białkowe czynniki neuroprotektcyjne, m.in. czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgo-

Adres do korespondencji: Bogusław Machaliński, Zakład Patologii Ogólnej Katedry Fizjopatologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, e-mail: machalin@pum.edu.pl

Pracę otrzymano: 27.03.2012; przyjęto do druku: 2.07.2012

wego (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), neurotrofinę 3 (NT-3) i 4 (NT-4). Są one syntetyzowane i wydzielane przez komórki nerwowe mózgu, rdzenia kręgowego oraz komórki tkanek zależnych od obwodowych neuronów czuciowych, ruchowych i współczulnych. Pełnią ważne i zróżnicowane funkcje, regulują m.in. przeżycie, różnicowanie, dojrzewanie, tworzenie synaps i wzrost neuronów, zarówno w życiu embrionalnym, jak i dorosłym. Odkrycie tych cząsteczek stało się kluczowe dla zrozumienia etiopatogenezy wielu chorób układu nerwowego, procesów neuroregeneracji i dało nadzieję na opracowanie nowych terapii schorzeń neurologicznych. Dzisiaj już wiadomo, że równowaga pomiędzy procesami neuroregeneracji i neurodegeneracji w dużej mierze jest zależna od dostępności i aktywności odpowiednich czynników neurotroficznych.

Czynniki neurotroficzne – krótka charakterystyka

Tradycyjnie wyodrębnia się trzy rodziny czynników neurotroficznych: pierwszą stanowią „klasyczne” neurotrofiny, tj. NGF, BDNF, NT-3, NT-4; druga rodzina białek neurotroficznych obejmuje ligandy czynnika neurotroficznego pochodzenia glejowego (*glial cell derived neurotrophic factor* – GDNF); do trzeciej grupy zalicza się natomiast cytokiny neuropoetyczne [3].

Neurotrofiny NGF, BDNF, NT-3 i NT-4 to białka występujące najczęściej w postaci niekowalencyjnie związanych homodimerów, w pewnych sytuacjach zdolne są jednak również do tworzenia struktur heterodimerycznych (NT-3/BDNF, NT-4/BDNF i inne). Chociaż większość z nich pozbawiona jest aktywności mitogennej, zalicza się je aktualnie do czynników wzrostu. Większość białek tej grupy wykazuje wielokierunkowe działanie, nieograniczone ściśle do tkanki nerwowej. Wykazano na przykład, że w sercu dotkniętym zawałem zwiększają przeżycie kardiomiocytów [4].

Czynnik wzrostu nerwów jest najlepiej poznaną neurotrofiną. Indukuje różnicowanie i reguluje przeżycie neuronów cholinergicznym przegrody, prądkowia oraz jądra podstawnego wielkokomórkowego [5]. Wpływa na komórki Schwanna i fibroblasty, działa troficznie na neurony zwoju korzenia grzbietowego i zwoju współczulnego [6]. Czynnikiem ten promuje ponadto różnicowanie prekursorów w kierunku neuronów współczulnych w nadnerczach. Bierze także udział w dojrzewaniu wstępujących włókien nocyceptywnych typu C i Aδ [6]. Pod wpływem NGF nasila się ekspresja małych peptydów sygnałowych, takich jak substancja P i peptyd pochodny genu kalcy-

toninowego (*calcitonin gene related peptide* – CGRP) [6]. Czynnikiem wzrostu nerwów powoduje również wzrost syntezy i metabolizmu acetylocholino-esterazy. Największe stężenie tej neurotrofiny stwierdzono w hipokampie. W razie uszkodzenia mózgu poziom NGF znacząco zwiększa interleukina 8 (IL-8), która pobudza wydzielanie tego białka w astrocytarnych kulturach tkankowych [7].

Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego jest historycznie drugą odkrytą neurotrofiną syntetyzowaną w neuronach czuciowych [8]. Podobnie jak NGF, działa na stożki wzrostu neurytów w zwojach współczulnych jako chemoatraktant. Wraz z substancjami o działaniu przeciwnym (chemorepellentami) warunkuje prawidłową innerwację miejsc docelowych [6]. Zależne od BDNF są m.in. włókna wstępujące mechanoreceptorów, komórki zwojowe siatkówki i neurony hipokampa. Działanie tego czynnika w dużej mierze zależne jest od dostępności innych neurotrofin, m.in. NT-3, która, podobnie jak BDNF, wykazuje silne działanie neurogeneracyjne. Obydwa białka uczestniczą w prawidłowej synaptogenezie pomiędzy motoneuronami i włóknami dośrodkowymi Ia w obrębie rdzenia kręgowego [9]. Czynnikiem neurotroficzny pochodzenia mózgowego i NT-3 wzmagają także obrót serotoniny i wpływają na funkcje neuronów serotonergicznym ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Dodatkowo zwiększają poziom noradrenaliny w tkankach. Uważa się, że BDNF może pełnić funkcję neuromodulatora przekazywania synaptycznego. Wraz z NT-3 oddziałuje na neurony glutaminergiczne i GABA-ergiczne. W obecności NT-4 BDNF wpływa natomiast na komórki ziarniste mózdzku i neurony dopaminergiczne śródmózgowia. Zależne od tych czynników są również neurony zwoju przedsionkowego, podczas gdy komórki zwoju spiralnego wymagają dostępności NT-3 [10]. Czynnikiem neurotroficzny pochodzenia mózgowego odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu hipokampa i kory nowej. Indukcja drgawek w obrębie rejonu hipokampa, stymulacja wzrokowa oraz wysiłek fizyczny silnie aktywują ekspresję tego czynnika [11]. Stężenie BDNF mierzone w hipokampie – strukturze mózgu odpowiedzialnej za pamięć – zwiększa się wraz z wydłużeniem czasu wykonywanych ćwiczeń fizycznych. Obniżenie poziomu neurotrofiny poprzez narażenie na stres, stany depresyjne czy u osób starszych prowadzi natomiast do pogorszenia zdolności zapamiętywania wyznaczonych zadań. Stwierdzono ponadto, że BDNF wykazuje działanie troficzne wobec komórek zwojowych siatkówki oraz wpływa na tworzenie przez nie dendrytów i aksonów [12].

W tym obszarze interesująca wydaje się obserwacja wskazująca, że NT-4 chroni neurony ciała kolankowatego bocznego przed zanikiem wywołanym jednooczną depryzacją wzrokową [13]. Neurotrofina 4 nie jest jednak niezbędna dla przeżycia organizmu. W modelu transgenicznym wykazano, że myszy pozbawione genu dla NT-4 mają jedynie niewielkiego stopnia deficyty i dożywają wieku dojrzałego [14].

Czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego, podobnie jak NGF i BDNF, zwiększa przeżywalność neuronów czuciowych oraz działa troficznie na motoneurony rdzenia kręgowego. Nadekspresja GDNF w prądkowiu polepsza przekaznictwo dopaminergiczne w eksperymentalnych modelach choroby Parkinsona (ChP) [15].

Rzęskowy czynnik neurotroficzny (*ciliary neurotrophic factor* – CNTF), wyizolowany pierwotnie ze zwoju rzęskowego, w indukowanym uszkodzeniu działa ochronnie na motoneurony rdzenia kręgowego. Największe stężenie CNTF zaobserwowano w opuszce węchowej i nerwie wzrokowym.

Czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (*pigment epithelium-derived factor* – PEDF), pierwotnie opisany jako białko charakterystyczne dla nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE), w obrębie OUN wykazuje również silną ekspresję w szyszynce, płatach potylicznych kory mózgowej, wzgórzu, podwzgórzu, hipokampie i jądrze migdałowatym. Stymuluje rozwój fotoreceptorów, działa troficznie na występujące w siatkówce komórki glejowe (komórki Müllera) oraz wykazuje silne działanie ochronne i antyapoptotyczne na neurony, zwłaszcza w obrębie mózdzku i rdzenia kręgowego [16].

Niektóre cytokiny spoza rodziny czynników neurotroficznych, m.in. czynnik wzrostu naskórka (*epidermal growth factor* – EGF), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (*insulin-like growth factor 1* – IGF-1), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor* – bFGF), czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor* – HGF), interleukina 6 (IL-6), erytropoetyna (EPO), trombopoetyna (TPO), czynnik stymulujący wzrost granulocytów (*granulocyte-colony stimulating factor* – G-CSF), naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular-endothelial growth factor* – VEGF), w różnym stopniu wpływają na przeżycie, dojrzewanie i funkcjonowanie układu nerwowego, regulują procesy neuroregeneracji/neurodegeneracji, a także wykazują działanie biologiczne na komórki macierzyste i progenitorowe.

Niedawno opisane białka: śródmózgowy czynnik neurotroficzny pochodzenia astrocytarnego (*mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* – MANF) oraz

mózgowy dopaminowy czynnik neurotroficzny (*cerebral dopamine neurotrophic factor* – CDNF), stanowią nową, ewolucyjnie konserwatywną rodzinę neurotrofin, zdolnych do ochrony i funkcjonalnej odnowy neuronów dopaminergicznych. Właściwości biologiczne tych czynników wykazano pierwotnie w szczurzym modelu ChP indukowanym 6-hydroksydopaminą. Śródmózgowy czynnik neurotroficzny pochodzenia astrocytarnego wykazuje silną ekspresję w neuronach, w obrębie mózgu największe jego stężenie stwierdzono w korze mózgowej, hipokampie oraz komórkach Purkiniego [17]. Dystrybucja CDNF w OUN jest zbliżona – występuje on w korze mózgu, hipokampie, śródmózgowiu, mózdzku, prądkowiu i substancji czarnej [18]. Struktura białek MANF i CDNF, jako unikatowa wśród neurotrofin oraz czynników wzrostu, definiuje nowy typ protein. Zawiera ona dwie charakterystyczne domeny: *N*-kończową podobną do sapozyny (*saposin-like N-terminal domain*) oraz *C*-kończową zawierającą motyw mostka cysteinowego CXXC. Sugeruje się, że MANF i CDNF ułatwiają tworzenie się mostków cysteinowych oraz fałdowanie białek w siateczce szorstkiej, a przez to zmniejszają stres związany z produkcją niesfałdowanych bądź nieprawidłowo sfałdowanych protein [3].

Białka receptorowe dla neurotrofin – klasyfikacja, występowanie, mechanizm działania

Czynniki neurotroficzne aktywują dwie klasy receptorów: p75NTR, należący do nadrodziny receptorów TNF, oraz rodzinę receptorów Trk (*tropomyosin receptor kinase*), wykazujących wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej [6].

Receptor p75NTR ma zdolność wiązania wszystkich neurotrofin. Jest przedstawicielem nadrodziny receptorowej, do której należą takie białka, jak: TNFR1 i TNFR2, Fas (Apo-1) OX40, CD27, CD30 i CD40 [19]. Fragment cytoplazmatyczny receptora jest krótki i nie posiada wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej [6]. Zawiera pojedynczą domenę mastoparonową zbliżoną do struktury toksyny jadu os – mastoparanu. Z tego powodu przypuszcza się, że może wiązać i działać pobudzająco na białka G [19]. Część cytoplazmatyczna zawiera ponadto sekwencję zwaną domeną śmierci (*death domain* – DD), homologiczną do występującej w TNFR i białku Fas. Odgrywa ona rolę w indukowaniu programowanej śmierci komórki. W trakcie wczesnych faz ontogenezy ekspresja p75NTR jest szeroko rozpowszechniona w układzie nerwowym. Później ulega ograniczeniu

do specyficznych populacji neuronów. Fakt ten świadczy o swoistości funkcjonalnej receptora [19].

Trk to receptory o wysokim powinowactwie należące do nadrodziny receptorów kinazy tyrozynowej, do której należą m.in. receptory dla EGF, płytkopochodnego czynnika wzrostu (*platelet-derived growth factor* – PDGF), receptory insulinowe, efryny (EPH) [20]. Wszystkie te białka mają wspólny mechanizm działania. Związanie z ligandem powoduje dimeryzację cząsteczek receptora i następczą aktywację kinazy tyrozynowej. Katalizuje ona fosforylację reszt tyrozynowych i aktywuje kolejne składowe szlaku transdukcji sygnału. Pula receptorów Trk jest sekwestrowana w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych w neuronach OUN. Dopiero w obecności wtórnego przekźnika, takiego jak jony wapnia czy cAMP, receptory są transportowane do błony komórkowej. Trk podzielono na trzy typy: TrkA, TrkB i TrkC [5]. Białka te wykazują specyficzność substratową. TrkA jest receptorem dla NGF, TrkB przekazuje sygnał aktywowany przez BDNF i NT-4, a TrkC wiąże NT-3. Wykryto wiele izoform tych receptorów, które powstają w wyniku alternatywnego splicingu mRNA [6].

Warto nadmienić, że dla niektórych neurotrofin, zwłaszcza odkrytych stosunkowo niedawno, np. PEDF, MANF, CDFN, pomimo szeroko zakrojonych badań, wciąż nie udało się odnaleźć i sklonować swoistych receptorów.

Transdukcja sygnału zależnego od neurotrofin – znaczenie biologiczne szlaków przekźnictwa w obrębie komórek nerwowych

Szlaki sygnałowe związane z p75NTR determinują przeżycie, apoptozę i wzrost aksonalny w zależności od poziomu neurotrofin oraz populacji komórek podlegających ich działaniu. Związanie neurotrofiny z receptorem skutkuje internalizacją utworzonego kompleksu. Zostaje on następnie przetransportowany wzdłuż aksonu do perikarionu i jądra komórkowego [6]. Aktywacja receptora p75NTR powoduje uczynnienie kwaśnej sfingomielinazy z następczym utworzeniem z fosfolipidów błonowych ceramidu [19], pełniącego funkcję przekźnika II rzędu w komórkowej transdukcji sygnału. Zróźnicowanie szlaków, na które ma wpływ, oddaje wielokierunkowość działania tej cząsteczki informacyjnej. Jednym z najistotniejszych jest szlak związany z indukcją zaprogramowanej śmierci komórki. Wiaże się on z uaktywnieniem kinazy Jun (JNK), która indukuje białko p53 będące głównym czynnikiem decydującym o losie

komórki. Embryony pozbawione ekspresji JNK1 i 2 na skutek zahamowanego procesu programowanej śmierci komórkowej wykazują wiele zaburzeń na wczesnym etapie rozwoju mózgu [21]. Kaskada kinazy Jun odgrywa zatem ważną rolę w regulacji apoptozy neuronów *in vivo*. Działanie ceramidu wiąże się ponadto z aktywacją czynnika transkrypcyjnego – NFκB, który podlegając aktywacji przez różne cytokiny, reguluje m.in. przeżycie neuronów czuciowych oraz współczulnych [6]. Działa on również na poziomie kaskady sygnałowej ERK i hamuje szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu/kinazy Akt (PI-3K/Akt). Ten ostatni jest związany z transdukcją sygnału receptorów Trk [6]. Interesujące zjawisko opisano w komórkach pozbawionych receptora p75NTR, które mogą żyć dłużej nawet w stanie niedoboru neurotrofin. Neurony cholinergiczne zlokalizowane w pniu mózgu, w których nie wykrywa się tego receptora, nie ulegają degradacji w przebiegu choroby Alzheimera. Z kolei te ze zwiększoną gęstością receptorową w zakresie p75NTR są silniej dotknięte zmianami zwyrodnieniowymi. Przypuszcza się, że p75NTR działa jako receptor konstytutywny, który przekazuje inną informację w stanie wolnym, a inną po związaniu neurotrofiny [19]. W świetle powyższych obserwacji uważa się, że p75NTR wykazuje działanie proapoptotyczne, funkcja receptorów z rodziny Trk sprowadza się natomiast do wyciszania tej aktywności [19]. Wspólna aktywacja p75NTR i Trk determinuje zatem przeżycie komórki, jednak w przypadku braku jednoczesnego pobudzenia Trk, neurotrofiny mogą silniej indukować zaprogramowaną śmierć komórki poprzez receptor p75NTR [6].

Receptory z rodziny Trk z nielicznymi wyjątkami promują przeżycie i/lub różnicowanie komórkowe niemal wszystkich populacji komórek nerwowych [6]. Pobudzenie tej grupy białek receptorowych prowadzi do zahamowania produkcji zarówno kwaśnej sfingomielinazy, jak i ceramidu oraz działa hamująco na aktywność JNK. Połączenie Trk ze swoistym ligandem skutkuje uczynnieniem kinazy tyrozynowej. Enzym ten katalizuje fosforylację reszt tyrozynowych i odsłania miejsca wiązania (tzw. SH2) w białkach efektorowych [20]. Związanie każdego z tych białek aktywuje kaskadę wtórnych przekźników uczestniczących w transdukcji sygnału. Na tej podstawie wyodrębniono główne szlaki przekazywania sygnału: szlak białka Ras/MAPK, kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K) i fosfolipazy C-γ (PLC-γ).

Aktywacja białka Ras jest kluczowa w prawidłowym procesie różnicowania neuronalnego i tworzenia wypustek nerwowych (neurytogeneza). Inicjuje drogi przekźzu sygnału przez kinazę MAP (*mitogen activated kinase* –

MAPK) lub PI-3K. Czas aktywacji kinazy MAP decyduje o dalszych zmianach na poziomie komórkowym. Chwilowa stymulacja indukuje bowiem odpowiedź proliferacyjną, a przedłużona kieruje komórki na drogę różnicowania. Kinaza aktywowana mitogenami wspólnie z innymi białkami składowymi kaskady sygnałowej powoduje fosforylację i uaktywnienie jądrowego czynnika transkrypcyjnego CREB (*cAMP-regulated enhancer binding protein*) [6]. Na tym etapie rozpoczyna się regulacja odpowiedzi komórkowej na poziomie genów.

Pobudzenie kinazy 3-fosfatydilinozytolu, która inicjuje drugi szlak przekazywania sygnału zależny od białka Ras, odgrywa ważną rolę w przeżyciu neuronów. Aktywna PI3-K włącza kinazę białkową Akt, ta z kolei inaktywuje proapoptotyczne białko BAD [6]. Szlak PI-3K/Akt powiązany jest z wieloma innymi czynnikami białkowymi mającymi wpływ na proces zaprogramowanej śmierci komórki, m.in. z czynnikiem transkrypcyjnym NFκB, FasL i kaspazą 9. Aktywność PI3-K reguluje ponadto polimeryzację i obrót aktyny F, co ma wpływ na zmiany w obrębie cytoskieletu komórki nerwowej i neurytogenezę [6].

Trzeci szlak, związany z fosfolipazą, generuje z fosfolipidów błony komórkowej znane przekaźniki II rzędu – trifosforan inozytolu (IP3) i diacyloglicerol (DAG). Pierwsza z wymienionych substancji zwiększa stężenie jonów Ca^{2+} w komórce i wpływa na czynność innych enzymów – zależnych od kalmoduliny kinaz białkowych i fosfataz. Diacyloglicerol stymuluje natomiast aktywność kinazy białkowej C (PKC), która jest ważną składową regulacji procesu neurytogenezy [6].

Interesujące wydaje się, że biologiczna aktywność nowej rodziny białek MANF i CDFN ukierunkowana na obniżenie stresu związanego z nieprawidłową funkcją siateczki endoplazmatycznej sugeruje, że czynniki te mogą aktywować zupełnie inne szlaki sygnałowe niż opisane dotychczas dla pozostałych neurotrofin [16,22].

Wykorzystanie czynników neurotroficznych w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych na przykładzie stwardnienia zanikowego bocznego i choroby Parkinsona – badania doświadczalne i próby kliniczne

Odkrycie i poznanie funkcji neurotrofin oraz pozostałych białek o działaniu neuroprotekcijnym dało nadzieję na opracowanie nowych metod terapii chorób neurodegeneracyjnych. Aktualnie na świecie prowadzonych

jest wiele badań przedklinicznych i klinicznych z zastosowaniem czynników neurotroficznych. Stosunkowo najbardziej zaawansowane są próby wykorzystania tych substancji w leczeniu ciężkich schorzeń neurodegeneracyjnych: stwardnienia zanikowego bocznego (*amyotrophic lateral sclerosis* – ALS) i ChP.

Stwardnienie zanikowe boczne jest postępującą, nieuleczalną i śmiertelną chorobą dotyczącą motoneuronu górnego i dolnego. Ryzyko zachorowania wynosi 1 : 800. Charakteryzuje się progresywnie przebiegającym osłabieniem oraz utratą siły mięśniowej z następczą niewydolnością oddechową. Śmierć pacjenta następuje w czasie od 3 do 5 lat od rozpoznania. Patofizjologia tej jednostki nie została w pełni poznana [23]. W proces patologiczny zaangażowane są zarówno komórki astrogleju, jak i mikrogleju oraz limfocyty T. Nie jest do końca jasne, gdzie lokalizuje się pierwotne miejsce wystąpienia zmian. Sugeruje się, że może nim być złącze nerwowo-mięśniowe, akson, mitochondria lub jądro komórkowe. Na poziomie molekularnym ważną, ale nie jedyną rolę odgrywa proces ekscytotoksyczności [24]. Wiąże się on z nadmiernym pobudzeniem glutaminergicznym, które prowadzi do zwyrodnienia i śmierci komórek nerwowych. Jedynym dostępnym obecnie lekiem jest ryluzol, hamujący proces ekscytotoksyczności i wydłużający przeżycie pacjentów o 2–3 miesiące [25]. Wobec braku leczenia przyczynowego racjonalne wydaje się wykorzystanie czynników neurotroficznych w ochronie i promowaniu przeżycia motoneuronów.

W badaniach przedklinicznych w mysim modelu transgenicznym ALS (mutacja SOD-1) stwierdzono korzystną rolę BDNF w promowaniu przeżycia motoneuronów. Neurotrofina ta wykazuje ponadto dodatkowe działanie protekcyjne wobec zjawiska ekscytotoksyczności w warunkach *in vivo*. W badaniu klinicznym z 1999 r. przeprowadzonym na grupie 1000 chorych nie wykazano skuteczności BDNF podawanej w formie wstrzyknięć podskórnych [26]. Nie zaobserwowano również korzystnych rezultatów po podaniu dokanałowym [27]. Przypuszcza się, że niepowodzenia te mogą być wynikiem stymulacji przez BDNF zarówno przeżycia, jak i apoptozy komórek nerwowych. Brakuje ponadto jednoznacznych badań potwierdzających przenikanie BDNF przez barierę krew–mózg. Inne neurotrofiny (np. CNTF) podawane we wstrzyknięciu podskórnym też nie wykazywały skuteczności klinicznej, być może ze względu na bardzo krótki okres półtrwania [28].

Kolejne obserwacje kliniczne prowadzone w ALS ujawniły zwiększone stężenie GDNF w płynie mózgowo-rdzeniowym [29] i większą ekspresję receptora dla tego

czynnika w rdzeniu kręgowym i mięśniach, nawet w późnych stadiach choroby [30]. Czynniki neurotroficzne pochodzenia glistowego, z powodu silnego działania neuroprotektynowego wobec motoneuronów, powinny być brane pod uwagę w przyszłych próbach klinicznych. Problemem jest jednak w tym przypadku brak zdolności przekraczania bariery krew–mózg. Dowiedziano natomiast skuteczności GDNF przy podaniu domózgowym w ChP [31].

Niezależnie od „klasycznych” czynników neurotroficznych, także inne cytokiny o ustalonym działaniu neuroprotektynowym badane są pod kątem potencjalnej przydatności w terapii ALS. Pod koniec lat 80. odkryto i opisano wpływ IGF-1 na tkankę nerwową. Neurony i komórki glistowe OUN mają na swojej powierzchni funkcjonalne receptory dla tego czynnika. Insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 w warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazuje działanie cytoprotekcyjne i promuje przeżycie motoneuronów, a także zmniejsza ekscytotoksyczność glutaminergiczną [32]. Bezpieczeństwo i skuteczność rekombinowanego IGF-1 oceniono następnie u pacjentów w trzech badaniach klinicznych [33–35]. W jednym z badań (*The North America ALS/IGF-I Study Group*) wykazano, że lek jest bezpieczny, dobrze tolerowany, spowalnia progresję choroby i zwiększa jakość życia pacjentów [33], jednakże w innej, niezależnej analizie klinicznej (*European ALS/IGF-I Study Group*) nie zaobserwowano istotnej skuteczności [34]. W trzeciej próbie klinicznej w okresie dwuletniej obserwacji nie stwierdzono różnicy w punktach końcowych w grupie badanej i kontrolnej [35]. Zwrócono jednak uwagę, że dawki, które zastosowano w badaniach, mogły być zbyt małe i IGF-1 mógł nie osiągnąć stężeń terapeutycznych w płynie mózgowo-rdzeniowym i OUN.

Kolejną intensywnie badaną cytokiną jest VEGF, będący uznanym czynnikiem promującym wzrost śródbłonna i angiogenezę, lecz wykazujący także działanie neurotroficzne. W niektórych populacjach polimorfizm VEGF wiąże się z ryzykiem wystąpienia ALS [36]. Czynniki te promuje przeżycie motoneuronów i zmniejsza ekscytotoksyczność glutaminergiczną w mysim modelu badawczym. Opóźnia ponadto rozwój choroby, utratę funkcji motorycznych i działa korzystnie na złącze nerwowo-mięśniowe w modelach zwierzęcych. U chorych na ALS wykryto zmniejszone stężenie VEGF w płynie mózgowo-rdzeniowym [37]. Możliwe, że przywrócenie jego prawidłowego stężenia mogłoby przynieść korzyści terapeutyczne. Nie bez znaczenia jest również to, że VEGF skutecznie przenika przez barierę krew–mózg.

Do cytokin zmniejszających ekscytotoksyczność oraz wykazujących działanie protekcyjne wobec motoneuronów należy HGF. W modelach zwierzęcych HGF podany dooponowo redukuje degenerację neuronalną i zwiększa przeżycie komórek nerwowych [38]. W badaniach klinicznych wykazano nieprawidłowe stężenie HGF w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na ALS. Przypuszcza się, że zaburzenie w układzie regulującym stężenie HGF może być przyczyną narastania zmian degeneracyjnych w rodzinnej postaci ALS. Choć czynniki te promuje tworzenie prawidłowych złączy nerwowo-mięśniowych, efektywne działanie wywiera jedynie w kombinacji z innymi czynnikami neurotroficznymi [39]. Dokładne ustalenie roli HGF w ewentualnej farmakoterapii wymaga więc dalszych badań klinicznych.

Grupa FGF obejmuje białka stymulujące procesy naprawcze tkanki łącznej, angiogenezę, różnicowanie komórkowe i rozwój embrionalny. Odkrycie, że bFGF osiąga największe stężenia w OUN, zwróciło uwagę badaczy na jego funkcje w procesach neuroregeneracji [40]. Ekspresję mRNA dla receptora FGF wykazano w neuronach cholinergicznym, układzie limbicznym, jądrach pnia mózgu, neuronach rdzenia kręgowego oraz komórkach ziarnistych i Purkiniego w mózdzku. Choć wykazano, że bFGF odznacza się działaniem protekcyjnym wobec uszkodzonych motoneuronów, w pewnych warunkach w przebiegu ALS może jednak włączać ścieżkę apoptozy zależną od reaktywności astrocytów [41]. W celu jasnego zdefiniowania roli FGF w patofizjologii i potencjalnej farmakoterapii ALS potrzebne są bardziej szczegółowe badania.

Badania nad mechanizmami hipoksji doprowadziły do odkrycia aktywności EPO i ekspresji jej receptorów w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym [42]. Erytropoetyna działa ochronnie na neurony w warunkach niedotlenienia, niedokrwienia i wynikającego z nich stresu metabolicznego. Wykazuje działanie przeciwzapalne i antyapoptotyczne, wzmacnia regenerację złączy nerwowo-mięśniowych po uszkodzeniu mechanicznym [43]. Dodatkową ważną jej cechą jest zdolność przenikania przez barierę krew–mózg. Przydatność EPO w terapii ALS wstępnie oceniono w grupie 23 pacjentów w badaniu klinicznym II fazy z randomizacją, przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby. Lek podawany w postaci wstrzyknięć podskórnych okazał się bezpieczny i dobrze tolerowany [44]. Szczególne zainteresowanie skierowane jest obecnie w kierunku karbonylowanej formy EPO (CEPO). Dzięki modyfikacji chemicznej zachowuje ona działanie neurotroficzne przy

jednoczesnym braku aktywności hematopoetycznej. Warto nadmienić, że w przeciwieństwie do EPO oraz większości innych czynników hematopoetycznych, trombopoetyna (TPO) pobudza apoptozę neuronów i hamuje różnicowanie neuronalne [45].

W trakcie zaawansowanych badań eksperymentalnych nad przydatnością w terapii ALS jest również G-CSF. Dotychczas szczegółowo opisano jego aktywność neuroprotekcijną i regeneracyjną w mózgu i rdzeniu kręgowym [46]. Ekspresję receptora dla G-CSF stwierdzono w wielu różnych rejonach układu nerwowego, szczególnie silną jednak w motoneuronach rdzenia kręgowego. W przypadku uszkodzenia rdzenia kręgowego G-CSF działa stymulująco na zachowanie integralności szlaków nerwowych [47]. Indukuje ponadto różnicowanie progenitorów neuronalnych, zwiększa wzrost neurytów *in vitro*, wzmacnia regenerację aksonalną i reinnervację mięśni. Jak wykazano w mysim, transgenicznym modelu ALS, czynnik ten podany podskórnie spowalnia progresję choroby i zwiększa przeżycie zwierząt [48]. W dotychczas przeprowadzonych dwóch niewielkich, pilotażowych próbach klinicznych w grupie 39 pacjentów, rekombinowany G-CSF okazał się bezpieczny i dobrze tolerowany [49,50]. W jednym z tych badań zaobserwowano spowolnienie progresji choroby [50].

Próby zastosowania czynników neurotroficznych w leczeniu ChP prowadzone są dotychczas na mniejszą skalę i nie są tak zaawansowane jak w przypadku ALS. Wykazano, że szczególnie silnym działaniem neuroprotekcijnym wobec neuronów dopaminergicznych odznacza się GDNF. W jednym z pierwszych badań eksperymentalnych opublikowanych w latach 90. XX w. stwierdzono, że u małp z parkinsonizmem połowicznym indukowanym neurotoksyną MPTP (1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna) comiesięczne dokomorowe podawanie GDNF poprawiło stan kliniczny [51,52]. W szeregu doniesień opisano również skuteczne działanie terapeutyczne tego czynnika u gryzoni [53-55]. Stwierdzono jednak, że pozytywny wpływ egzogenego GDNF ograniczają zarówno brak zdolności do pokonywania bariery krew-mózg, jak i działania niepożądane wynikające z pobudzania receptorów zlokalizowanych w innych narządach. W celu wyeliminowania tych problemów podjęto interesujące próby podawania GDNF bezpośrednio do prądkowia [56].

Na podstawie doświadczeń i zachęcających danych uzyskanych w modelach zwierzęcych rozpoczęto pierwsze badania u pacjentów. Chorym z zaawansowaną postacią ChP podawano ludzki rekombinowany metionilo-GDNF poprzez implantowany podskórnie port

połączony z dokomorową kaniulą. Nie odnotowano jednak istotnej poprawy klinicznej [57]. Inne wyniki uzyskał Gill i wsp., którzy 5 chorym na ChP podawali GDNF bezpośrednio do tylnej części skorupy, stanowiącej boczny fragment jądra soczewkowatego mózgu. Uzyskali oni znaczącą i szybką poprawę, która utrzymywała się do 2 lat [58]. Wyniki uzyskane przez Gilla i wsp. zachęciły do podjęcia następnych prób klinicznych z użyciem GDNF, jednak ich rezultaty są niejednoznaczne. Trzydziestu czterem chorych z umiarkowaną zaawansowaną ChP podawano neurotrofinę w dawce 15 µg do skorupy codziennie przez okres od 1 do 3 miesięcy. Nie uzyskano żadnych klinicznych efektów [59]. Z kolei Slevin i wsp. odnotowali, że GDNF zastosowany w dawce do 30 µg/dobę w okresie rocznej obserwacji prowadził do poprawy stanu badanych pacjentów [60]. W innych przeprowadzonych dotychczas próbach klinicznych, w tym również z użyciem terapii genowej, uzyskiwano również rozbieżne wyniki [61,62].

Odkrycie nowej, ewolucyjnie konserwatywnej rodziny dopaminergicznych czynników neurotroficznych otworzyło szersze pole do badań eksperymentalnych i klinicznych. Dowiedziano, że MANF i CDFN wykazują działanie ochronne i naprawcze wobec neuronów dopaminergicznych w szczurzym modelu ChP indukowanej podaniem 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) [63,64]. Stwierdzono ponadto, że w terapiach eksperymentalnych CDFN jest co najmniej tak samo skuteczny jak GDNF, odznacza się jednak większą swoistością wobec ośrodkowych neuronów dopaminergicznych. W przeciwieństwie do pozostałych opisanych neurotrofin, MANF i CDFN nie wykazują działania na neurony czuciowe i obwodowe sympatyczne w warunkach *in vitro*, co sugeruje potencjalnie mniejszy wachlarz oddziaływań niepożądanych w sytuacji klinicznej [22]. Wszystkie te cechy wskazują, że białka te mogą w niedalekiej przyszłości znaleźć zastosowanie w nowych aplikacjach terapeutycznych u ludzi.

Adiuwantowa terapia komórkowa schorzeń neurodegeneracyjnych – podstawy teoretyczne, badania aplikacyjne, kierunki rozwoju

Odnutowywany ostatnio dynamiczny postęp wiedzy na temat biologii komórek macierzystych rozbudził nadzieje na skuteczną terapię nieuleczalnych dotychczas ciężkich schorzeń neurodegeneracyjnych za pomocą transplantacji komórek regenerujących. W swoich założeniach terapia komórkowa obliczona jest na urucho-

mienie szerokiego wachlarza reakcji w obszarze mikrośrodowiska tkanki nerwowej i wzmocnienie cytoprotekcji w bezpośrednim odniesieniu do neuronów. Pośród oczekiwanych oddziaływań i mechanizmów regeneracji realizowanych za pomocą transplantowanych komórek macierzystych (*stem cells* – SCs) u pacjentów ze schorzeniami neurodegeneracyjnymi należy wskazać: wsparcie troficzne dla neuronów gospodarza, spowolnienie procesu zwyrodnieniowego, wydzielanie brakujących neurotransmiterów, różnicowanie w kierunku komórek progenitorowych oligodendrogleju czy różnicowanie w kierunku neuronów.

Komórki macierzyste definiowane są jako komórki posiadające zdolność do samoodnowy oraz wielokierunkowego różnicowania [65]. Nerwowe komórki macierzyste (*neural stem cells* – NSCs), które proliferują w strefie komorowej, a następnie podkomorowej (*subventricular zone* – SVZ) rozwijającego się mózgu, dają początek trzem szeregom komórkowym OUN: neuronom, astrocytom i oligodendrocytom. Identyfikacja NSCs i progenitorów specyficznych dla poszczególnych szeregów komórkowych w mózgu dorosłego człowieka znacząco zmieniła funkcjonujący od wielu lat pogląd na mózg jako narząd niemający zdolności do odnowy komórkowej. Nerwowe komórki macierzyste i progenitorowe zidentyfikowano w kilku swoistych regionach OUN, gdzie podlegają proliferacji i różnicowaniu do komórek potomnych. Nowe neurony tworzone są w sposób ciągły w przedniej części SVZ, z której migrują następnie poprzez rostralny strumień migracji do nąbłonka węchowego. Postępująca w ciągu życia osobniczego neurogeneza zachodzi ponadto w obrębie zakrętu zębatego hipokampa, w którym powstają neurony warstwy ziarnistej.

Wstępne badania naszego zespołu, jak również doniesienia innych autorów ujawniły, że NSCs wykazują ekspresję receptorów dla czynników neurotroficznych, co może przemawiać za tym, że proces neurogenezy jest regulowany i zależny od dostępności neurotrofin w mikrośrodowisku tkankowym. Jednak NSCs nie są jedynym możliwym źródłem komórkowym dla tworzenia/odtworzenia dojrzałych neuronów. Wykazano, że mogą je stanowić także inne populacje komórek macierzystych, takie jak: embrionalne komórki macierzyste, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, mezenchymalne komórki macierzyste i inne. Każda z tych populacji cechuje się odmiennymi właściwościami i sposobami pozyskiwania.

Embrionalne komórki macierzyste (*embryonic stem cells* – ESCs), jako prymitywne komórki pluripotencjalne, zdolne są do różnicowania we wszelkie rodzaje doj-

rzałych elementów morfotycznych organizmu, w tym wszystkie opisane typy komórek nerwowych. Mogą być pozyskiwane z zarodków w stadium fizjologicznej blastocysty lub tworzonych *in vitro* za pomocą metod tzw. klonowania terapeutycznego. W modelach badawczych komórki te wykazują jednak silną tendencję do transformacji nowotworowej. Odnaczają się ponadto dużą immunogennością, co niekorzystnie wpływa na przyjęcie przeszczepu komórkowego przez organizm biorcy. W zwierzęcych modelach badawczych ALS wykazano, że transplantowane ESCs zdolne są do generowania dolnych motoneuronów, co skutkowało zmniejszeniem deficytów związanych z chorobą [66]. Z kolei w ChP neurony dopaminergiczne powstałe z przeszczepionych ESCs cechowały się słabszą przeżywalnością i/lub mniej korzystnym fenotypem niż komórki pozyskiwane bezpośrednio z tkanki płodowej. W przypadku potencjalnego wykorzystania ESCs w medycynie regeneracyjnej największym wyzwaniem jest podtrzymanie ich prawidłowego różnicowania i eliminacja zagrożenia nowotworzeniem. W wielu kręgach kulturowych sposób pozyskiwania ESCs związany ze zniszczeniem zarodka w stadium blastocysty, a zatem życia ludzkiego, nie jest akceptowalny z etycznego punktu widzenia.

Utworzenie pluripotencjalnych SCs z komórek somatycznych pacjenta w warunkach *ex vivo* mogłoby się przyczynić do odnowy populacji komórkowej bezpośrednio dotkniętej degeneracją w przebiegu choroby. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*induced pluripotent stem cells* – iPS), produkowane bezpośrednio z fibroblastów chorego na ALS, wykazują zdolność różnicowania w kierunku motoneuronów i być może mogłyby w przyszłości znaleźć zastosowanie w autologicznej terapii komórkowej [67].

W 2006 r. odkryto i opisano w szpiku kostnym dorosłych myszy populację bardzo małych, podobnych do embrionalnych komórek macierzystych (*very small embryonic-like stem cells* – VSEL SCs) o fenotypie Sca-1 + lin-CD45-, wykazujących ekspresję markerów charakterystycznych dla embrionalnych komórek pluripotencjalnych, m.in. SSEA-4, Oct-4, Nanog, Rex-1, telomerowego białka Rif-1 [68]. Dalsze badania, z udziałem także naszej grupy badawczej, wykazały, że VSEL SCs obecne są również w organizmie człowieka i podlegają mobilizacji ze szpiku do krwi obwodowej w odpowiedzi na ostry stres, m.in. u pacjentów ze świeżym udarem niedokrwinnym mózgu [69]. Może to pośrednio świadczyć o ich roli w reakcjach patofizjologicznych na poziomie ogólnoustrojowym, w tym również w mechanizmach neuroregeneracji i neuroprotekcji.

Nie opisano jednak dotychczas w sposób bezpośredni ich przydatności aplikacyjnej w terapii komórkowej.

Wczesne ontogenetycznie i niezdeteminowane hematopoetycznie komórki macierzyste krwi pępowinowej (CD34⁺) opisał polski zespół badawczy pod kierunkiem prof. K. Domańskiej-Janik. W określonych warunkach komórki te mogą przejawiać różnicowanie neuronalne, nie wykazują tendencji do nowotworzenia w warunkach *in vivo*, a na podstawie wstępnych obserwacji eksperymentalnych i klinicznych można przypuszczać, że w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w rozwijającym się obszarze terapii komórkowej schorzeń neurodegeneracyjnych [70].

Mezenchymalne komórki macierzyste (*mesenchymal stem cells* – MSCs) występują głównie w szpiku kostnym, tkance tłuszczowej i krwi obwodowej [52]. Pełnią fizjologiczną funkcję m.in. w formowaniu niszy dla komórek hematopoetycznych w szpiku kostnym. Wykazano, że zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* mogą się różnicować w neurony i komórki glejowe [71]. Migrując w obrębie OUN, promują produkcję BDNF i indukują proliferację progenitorów oligodendrogleju. Łatwość pozyskiwania i ekspansji *ex vivo* są dużymi zaletami tych komórek. Wykazują przy tym stabilność chromosomalną i brak tendencji do transformacji nowotworowej. Wymienione cechy sprawiają, że MSCs chętnie poddawane są modyfikacji genetycznej w celu uzyskania dodatkowych, korzystnych cech fenotypowych i funkcjonalnych. Zgodnie z tym w modelach zwierzęcych ALS wykazano, że zmodyfikowane MSCs z indukowaną nadekspresją GDNF zmniejszały progresję choroby i opóźniały utratę funkcji motorycznych [72]. Trwają zaawansowane prace i próby kliniczne z wykorzystaniem autologicznych MSCs pozyskiwanych ze szpiku kostnego w leczeniu chorych na ALS. Wstępne wyniki takich przeszczepień u kilku chorych były zadowalające. Stwierdzono istotne zwolnienie liniowego spadku pojemności życiowej płuc u niemal połowy leczonych pacjentów 36 miesięcy po przeszczepieniu, a samo leczenie było dobrze tolerowane przez chorych [73].

Przeszczepienie MSCs lub modyfikowanych MSCs z nadekspresją BDNF wykazało korzystne efekty także w szczurzym modelu ChP poprzez zahamowanie delekcji neuronów dopaminergicznych i stymulację procesów regeneracyjnych [74].

Wyjaśnienie naturalnej zdolności MSCs do promowania wzrostu i przeżycia komórek nerwowych oraz zwiększania długości neurytów stanowi aktualnie ważne pole badań. Kluczowe wydaje się określenie, które z czynników neurotroficznych i w jakich warunkach ulegają

ekspresji w MSCs. Wykazano, że swoiste subpopulacje ludzkich MSCs wykazują ekspresję BDNF oraz β -NGF, nie syntetyzują natomiast NT-3 i NT-4 [75]. Zdolność tych komórek do produkcji BDNF potwierdzono także w innych doniesieniach [76]. W analizach przeprowadzonych przez naszą grupę badawczą stwierdzono, że zarówno MSCs, jak i inne populacje SCs (komórki liniowo negatywne, CD34⁺, CD133⁺) pochodzące z dorosłych tkanek (szpik kostny, krew pępowinowa) wykazują stałą ekspresję czynników neurotroficznych i ich receptorów. Krótkoterminowa inkubacja w warunkach *ex vivo* prowadzi natomiast do nasilenia się syntezy NTs, ocenianej na poziomie mRNA i białka [Paczkowska E. i wsp.; dane nieopublikowane]. Obserwacja ta może sugerować, że wydzielanie czynników neuroprotektoryjnych przez MSCs wszczepione do tkanek (np. doszkliskowo) jest stosunkowo wydajna.

Wszystkie opisane powyżej cechy stanowią zatem o niewątpliwiej atrakcyjności MSCs jako populacji komórkowej o potencjalnym działaniu neuroprotektoryjnym, a pierwsze pionierskie dane z podejmowanych prób klinicznych dają nadzieje na ich szersze wykorzystanie w adiuwantowej terapii komórkowej.

Podsumowanie

Dotychczasowe doświadczenia w obszarze terapii komórkowej schorzeń neurodegeneracyjnych oraz kluczowa rola czynników neurotroficznych w procesach neuroprotekcji i neurogeneracji wskazują, że połączenie strategii terapii komórkowej z elementami terapii genowej mogłoby przynieść wymierne korzyści lecznicze. Przeszczepianie autologicznych komórek z indukowaną nadekspresją określonych neurotrofin wzmocniłoby, jak się wydaje, reakcje ogólnoustrojowe obserwowane po podaniu czynników białkowych, jak również efekty regeneracyjne opisywane po zastosowaniu samych komórek. Okres fizjologicznego półtrwania większości neurotrofin w płynach ustrojowych jest bardzo krótki, zatem próby leczenia z użyciem dostępnych rekombinowanych czynników byłyby drogie, a efekty krótkotrwałe. Podanie zmodyfikowanych genetycznie SCs zapewniłoby dłuższe i stabilne wydzielanie pożądanych rozpuszczalnych czynników neurotroficznych i wytworzyłoby odpowiednie mikrośrodowisko dla aktywności regeneracyjnej tkanki nerwowej. Pierwsze doniesienia na temat efektów takiej patofizjologicznej kompilacji po przeszczepieniu MSCs z nadekspresją neurotrofin są zachęcające [77]. Pomimo dużego postępu wiedzy i doświadczeń badaw-

czych nagromadzonych w ostatnich latach, nadal należy wypracować bezpieczny dla pacjenta i skuteczny protokół metodologiczny, uwzględniający optymalny typ przeszczepianych komórek i drogę ich podawania.

W podsumowaniu można stwierdzić, że rola czynników neurotroficznych i ich efektów parakrynych jest bardzo istotna zarówno w procesach endogennej regeneracji układu nerwowego, jak i leczeniu schorzeń neurodegeneracyjnych. Systematyczne poznawanie kolejnych aspektów patofizjologicznych determinujących odbudowę tkanki nerwowej w warunkach *in vivo* jest niezbędne dla optymalizacji protokołów terapeutycznych i wdrożenia ich do działań klinicznych.

Oświadczenie

Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

- Ramón y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. *Oxford University Press*, New York 1928.
- Cohen S., Levi-Montalcini R. Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. *Cancer Res* 1957; 17: 15-20.
- Lindholm P., Saarma M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* 2010; 70: 360-371.
- Meloni M., Caporali A., Graiani G. i wsp. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circ Res* 2010; 106: 1275-1284.
- Vahlsing H.L., Hagg T., Spencer M. i wsp. Dose-dependent responses to nerve growth-factor by adult rat cholinergic medial septum and neostriatum neurons. *Brain Res* 1991; 552: 320-329.
- Huang E.J., Reichardt L. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736.
- Giulian D., Young D.G., Woodward J. i wsp. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci* 1988; 8: 709-714.
- Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982; 1: 549-553.
- Seebach B.S., Arvanov V., Mendell L.M. i wsp. Effects of BDNF and NT-3 on development of Ia/motoneuron functional connectivity in neonatal rats. *J Neurophysiol* 1999; 81: 2398-2405.
- Enfors P., Van De Water T., Loring J. i wsp. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 1995; 14: 1153-1164.
- Kornblum H.I., Sankar R., Shin D.H. i wsp. Induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA by seizures in neonatal and juvenile rat brain. *Mol Brain Res* 1997; 44: 219-228.
- Lom B., Cohen-Cory S. Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates retinal ganglion cells and axonal arborization in vivo. *J Neurosci* 1999; 19: 9928-9938.
- Riddle D.R., Lo D.C., Katz L.C. NT-4 mediated rescue of lateral geniculate neurons from effects of monocular deprivation. *Nature* 1995; 378: 189-191.
- Ibáñez C.F. Neurotrophin-4: the odd one out in the neurotrophin family. *Neurochem Res* 1996; 21: 787-793.
- Yasuhara T., Shingo T., Date I. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease. *Acta Med Okayama* 2007; 61: 51-56.
- Marciniak K., Butwicka A., Nowak J.Z. PEDF – endogenny czynnik o silnym działaniu neuroprotekcijnym, neurotroficznym i antyangiogennym. *Postępy Hig Med Dosw (Online)* 2006; 60: 387-396.
- Airavaara M., Chiocco M.J., Howard D.B. i wsp. Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury. *Exp Neurol* 2010; 225: 104-113.
- Sun Z.P., Gong L., Huang S.H. i wsp. Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. *J Neurochem* 2011; 117: 121-132.
- Nowak J.Z., Zawilska J.B. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. *PWN*, Warszawa 2004, ss. 525-551.
- Longstaff A. Krótkie wykłady. Neurobiologia. *PWN*, Warszawa 2002, ss. 461-468.
- Kuan C.Y., Yang D.D., Roy D.R.S. i wsp. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 1999; 22: 667-676.
- Andressoo J.O., Saarma M. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18: 297-306.
- Zawiślak D., Ostrowska M., Golenia A. i wsp. The -A162G polymorphism of the PON1 gene and the risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neurochir Pol* 2010; 44: 246-250.
- Mitchell J.D., Borasio G.D. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2007; 369: 2031-2041.
- Miller R.G., Mitchell J.D., Lyon M. i wsp. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 1: CD001447.
- BDNF Group. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: the BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 1999; 53: 1427-1433.
- Ochs G., Penn R.D., York M. i wsp. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000; 1: 201-206.
- Bognioanni P., Reali C., Sogos V. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for amyotrophic lateral sclerosis or motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 3: CD004302.
- Grundstrom E., Lindholm D., Johansson A. i wsp. GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 2000; 11: 1781-1783.
- Jiang Y.M., Yamamoto M., Kobayashi Y. i wsp. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005; 57: 236-251.
- Patel N.K., Bunnage M., Plaha P. i wsp. Intrathecal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol* 2005; 57: 298-302.

32. Bilak M.M., Corse A.M., Kuncel R.W. Additivity and potentiation of IGF-1 and GDNF in the complete rescue of postnatal motor neurons. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2001; 2: 83-91.
33. Lai E.C., Felice K.J., Festoff B.W. i wsp. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* 1997; 49: 1621-1630.
34. Borasio G.D., Robberecht W., Leigh P.N. i wsp. A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* 1998; 51: 583-586.
35. Sorenson E.J., Windbank A.J., Mandrekar J.N. i wsp. Subcutaneous IGF-I is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology* 2008; 17: 1770-1775.
36. Lambrechts D., Storkebaum E., Morimoto M. i wsp. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protect motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34: 383-394.
37. Devos D., Moreau C., Lassalle P. i wsp. Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. *Neurology* 2004; 62: 2127-2129.
38. Kadoyama K., Funakoshi H., Ohya W. i wsp. Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res* 2007; 59: 446-456.
39. Madhavan R., Peng H.B. HGF induction of postsynaptic specializations at the neuromuscular junction. *J Neurobiol* 2006; 66: 134-147.
40. Gonzalez A.M., Buscaglia M., Ong M. i wsp. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membrane of diverse tissues. *J Cell Biol* 1990; 110: 753-765.
41. Cassina P., Pehar M., Vargas M. i wsp. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2005; 93: 38-46.
42. Ehrenreich H., Timmer W., Siren A.L. A novel role for an established player: anemia drug erythropoietin for the treatment of cerebral hypoxia/ischemia. *Transfus Apher Sci* 2004; 31: 39-44.
43. Toth C., Martinez J.A., Lin W.Q. i wsp. Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. *Neuroscience* 2008; 154: 767-783.
44. Lauria G., Campanella A., Filippini G. i wsp. Erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis: A pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and tolerability. Neuromuscular Diseases Unit. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; 10: 410-415.
45. Samylenko A., Byts N., Rajalingam K. i wsp. Thrombopoietin inhibits nerve growth factor-induced neuronal differentiation and ERK signalling. *Cell* 2008; 20: 154-162.
46. Schneider A., Kruger C., Steigleder T. i wsp. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 2083-2098.
47. Pitzer C., Klusmann S., Krüger C. i wsp. The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *J Neurochem* 2010; 113: 930-942.
48. Pitzer C., Krüger C., Plaas C. i wsp. Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2008; 131: 3335-3347.
49. Cashman N., Tan L.Y., Krieger C. i wsp. Pilot study of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Muscle Nerve* 2008; 37: 620-625.
50. Nefussy B., Artamanov I., Deutsch V. i wsp. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Amyotroph Lateral Scler* 2010; 11: 187-193.
51. Gash D.M., Zhang Z., Ovadia A. i wsp. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 1996; 380: 252-255.
52. Zhang Z., Miyoshi Y., Lapchak P.A. i wsp. Dose response to intraventricular glial cell line-derived neurotrophic factor administration in parkinsonian monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1396-1401.
53. Hoffer B.J., Hoffman A., Bowenkamp K. i wsp. Glial cell Line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett* 1994; 182: 107-111.
54. Kearns C.M., Gash D.M. GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Res* 1995; 672: 104-111.
55. Kearns C.M., Cass W.A., Smoot K. i wsp. GDNF protection against 6-OHDA: time dependence and requirement for protein synthesis. *J Neurosci* 1997; 17: 7111-7118.
56. Lindvall O., Wahlberg L.U. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol* 2008; 209: 82-88.
57. Nutt J.G., Burchell K.J., Comella C.L. i wsp. Randomised, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 2002; 60: 69-73.
58. Gill S.S., Patel N.K., Hotton G.R. i wsp. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Nat Med* 2003; 9: 589-594.
59. Lang A.E., Gill S.S., Patel N.K. i wsp. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 459-466.
60. Slevin J.T., Gash D.M., Smith C.D. i wsp. Unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson's disease: response to 1 year of treatment and 1 year of withdrawal. *J Neurosurg* 2007; 106: 614-620.
61. Kaplitt M.G., Feigin A., Tang C. i wsp. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007; 369: 2097-2105.
62. Kierzyńska A., Kaźmierski R., Kozubski W. Educational level and cognitive impairment in patients with Parkinson disease. *Neurol Neurochir Pol* 2011; 45: 24-31.
63. Lindholm P., Voutilainen M.H., Laurén J. i wsp. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 2007; 448: 73-77.

64. Voutilainen M.H., Bäck S., Pörsti E. i wsp. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2009; 29: 9651-9659.
65. Paczkowska E., Dąbkowska E., Nowacki P. i wsp. Terapia komórkowa w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego. *Neurol Neurochir Pol* 2009; 43: 550-558.
66. Li X.J., Du Z.W., Zarnowska E.D. i wsp. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 215-221.
67. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K. i wsp. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321: 1218-1221.
68. Kucia M., Reza R., Campbell F.R. i wsp. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857-869.
69. Paczkowska E., Kucia M., Koziarska D. i wsp. Clinical evidence that very small embryonic-like (VSEL) stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke* 2009; 40: 1237-1244.
70. Domanska-Janik K., Buzanska L., Lukomska B. A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 237-248.
71. Li Y., Chen J., Zhang C.L. i wsp. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 2005; 49: 407-417.
72. Suzuki M., McHugh J., Tork C. i wsp. GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PLoS One* 2007; 2: e689.
73. Mazzini L., Ferrero I., Luparello V. i wsp. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I clinical trial. *Exp Neurol* 2010; 223: 229-237.
74. Sadan O., Bahat-Stromza M., Barhum Y. i wsp. Protective effects of neurotrophic factor-secreting cells in a 6-OHDA rat model of Parkinson disease. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 1179-1190.
75. Crigler L., Robey R.C., Asawachaicharn A. i wsp. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 2006; 198: 54-64.
76. Wilkins A., Kemp K., Ginty M. i wsp. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res* 2009; 3: 63-70.
77. Harper M.M., Grozdanic S.D., Blits B. i wsp. Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuro-protection in chronically hypertensive rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 4506-4515.